

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro

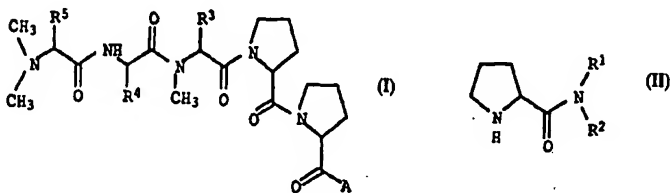


INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C07K 7/06, 5/06, 5/08, 5/10		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 97/05162
		(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:	13. Februar 1997 (13.02.97)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP96/03073		(74) Gemeinsamer Vertreter: BASF AKTIENGESELLSCHAFT; D-67056 Ludwigshafen (DE).	
(22) Internationales Anmeldedatum: 12. Juli 1996 (12.07.96)		(81) Bestimmungsstaaten: AU, BG, BR, CA, CN, CZ, HU, IL, JP, KR, MX, NO, NZ, PL, SG, SK, TR, UA, US, eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(30) Prioritätsdaten: 195 27 575.6 28. Juli 1995 (28.07.95) DE			
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BASF AK- TIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; D-67056 Ludwigshafen (DE).			
(72) Erfinder; und			
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): AMBERG, Wilhelm [DE/DE]; Stettiner Ring 24, D-61381 Friedrichsdorf (DE). BERNARD, Harald [DE/DE]; Valentin-Ostertag-Strasse 2, D-67098 Bad Dürkheim (DE). BUSCHMANN, Ernst [DE/DE]; Georg-Ludwig-Krebs-Strasse 10, D-67069 Lud- wigshafen (DE). HAUPT, Andreas [DE/US]; 2 Rosewood Place, Westborough, MA 01581 (US). JANSSEN, Bernd [DE/DE]; Leuschnerstrasse 18a, D-67063 Ludwigshafen (DE). ULRICH, Karl [DE/DE]; Grünerstrasse 7, D-67061 Ludwigshafen (DE). KLING, Andreas [DE/DE]; Riegeler Weg 14, D-68239 Mannheim (DE). MÜLLER, Stefan [DE/DE]; Viehtriftstrasse 105, D-67354 Römerberg (DE). RITTER, Kurt [DE/DE]; Albert-Mays-Strasse 12, D-69115		Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> <i>Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen</i> <i>Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen</i> <i>eintreffen.</i>	

(54) Title: PROCESS FOR PRODUCING DOLASTATIN 15 AND INTERMEDIATES THEREOF

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON DOLASTATIN 15 UND DEREN ZWISCHENPRODUKTEN



(57) Abstract

The description relates to a process for producing pentapeptides of the formula (I) in which A and R¹-R³ have the meanings given, in which the pentapeptide is constructed in steps from a prolinamide of the formula (II) in which R¹ and R² have the meanings given above, and the group -NR¹R² may be hydrolytically separated from the peptide thus obtained.

(57) Zusammenfassung

Es wird ein Verfahren zur Herstellung von Pentapeptiden der Formel (I), in der A und R¹-R³ die angegebene Bedeutung besitzen, beschrieben, welches darin besteht, daß man das Pentapeptid schrittweise ausgehend von einem Prolinamid der Formel (II), in der R¹ und R² die oben angegebene Bedeutung haben, aufbaut und dem so erhaltenen Peptid gegebenenfalls die Gruppe -NR¹R² hydrolytisch abspaltet.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfblögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AM	Armenien	GB	Vereinigtes Königreich	MX	Mexiko
AT	Österreich	GE	Georgien	NE	Niger
AU	Australien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BB	Barbados	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BE	Belgien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BF	Burkina Faso	IE	Irland	PL	Polen
BG	Bulgarien	IT	Italien	PT	Portugal
BJ	Benin	JP	Japan	RO	Rumänien
BR	Brasilien	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
BY	Belarus	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CA	Kanada	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SG	Singapur
CG	Kongo	KZ	Kasachstan	SI	Slowenien
CH	Schweiz	LI	Liechtenstein	SK	Slowakei
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CM	Kamerun	LR	Liberia	SZ	Swasiland
CN	China	LX	Litauen	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
EE	Estland	MG	Madagaskar	UG	Uganda
ES	Spanien	ML	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	MN	Mongolei	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MR	Mauritanien	VN	Vietnam
GA	Gabon	MW	Malawi		

VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON DOLASTATIN 15 UND DEREN ZWISCHENPRODUKTEN

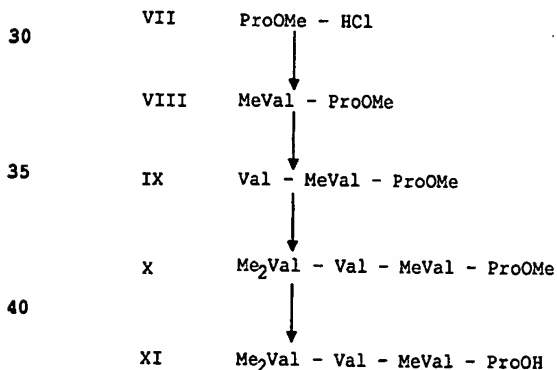
Beschreibung

5

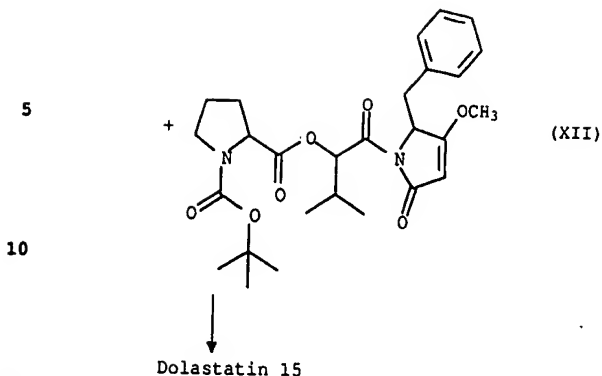
Die Erfindung betrifft ein neues Verfahren zur Herstellung von speziellen Pentapeptiden und die bei der Durchführung des Verfahrens entstehenden neuen Zwischenprodukte.

- 10 Dolastatin 15, ein peptidischer Wirkstoff isoliert aus dem Seehe-
sen *Dolabella auricularia* (G. R. Pettit et al., J. Org. Chem.
1982, 54, 6005), und strukturell verwandte synthetische Peptide,
die in WO 93 - 23 424 beschrieben sind, sind vielversprechende
neue Wirkstoffe, die sich teilweise bereits in klinischer Prüfung
15 befinden. Da eine Isolierung aus der natürlichen Quelle (6,2 mg
aus 1 600 kg Seehase) aussichtslos ist, richtet sich das Inter-
esse auf geeignete synthetische Verfahren, die Wirkstoffe in aus-
reichender Menge und Reinheit im technischen Maßstab zugänglich
machen.
- 20 Zwei Verfahren zur Herstellung von Dolastatin 15 sind beschrie-
ben: Die elegante Synthese von G. R. Pettit et al.
(J. Am.Chem.Soc. 1991, 113, 6692 und Tetrahedron 1994, 50, 12097)
stellt Dolastatin 15 ausgehend von Prolinmethylester-Hydrochlorid
25 her (Schema 1).

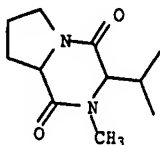
Schema 1



45



30



(XIII)

35

Diese Cyclisierungsreaktion, die im Labor nur zu geringen Ausbeuteverlusten führt, stört bei der Herstellung größerer Substanzmengen im technischen Maßstab beträchtlich.

- 40 3. Bei der Herstellung von VIII, IX und X werden jeweils Methylester eingesetzt. Bei den erforderlichen wäßrigen Aufarbeitungen auf diesen Stufen kommt es zur teilweisen Verseifung dieser Ester zu Carbonsäuren. Auch diese Nebenreaktion spielt bei der Maßstabsvergrößerung eine verstärkte Rolle, da sich
- 45 die Kontaktzeiten des Produktes mit Wasser bei der Reaktionsvergrößerung verlängern.

4. Hydrolyse-empfindlich ist auch der Depsipeptidbaustein XII, der bei der Isolierung und bei der Herstellung des Endproduktes zweimal mit Wasser in Berührung kommt. Die verlängerten Verweilzeiten des technischen Verfahrens führen auch hierbei zu Produktverlusten.

Ein zweites Verfahren zur Herstellung von Dolastatin 15 beschreiben Poncet et al. (Tetrahedron 48, 20, 4115-4112), die vom tert.-Butylester des Prolins ausgehen (Schema 2).

XIV Pro - OtBu x HCl

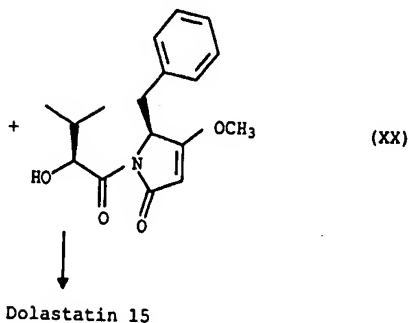
XV Pro - Pro - OtBu

XVI MeVal - Pro - Pro - OtBu

XVII Val - MeVal - Pro - Pro - Ot Bu

XVIII ZVal - Val - MeVal - Pro - Pro - OtBu

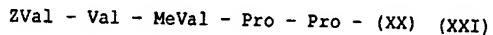
XIX ZVal - Val - MeVal - Pro - Pro - OH



Das Hydrochlorid des Prolin-tert.-butylesters ist weniger hygroskopisch als der nach Schema 1 eingesetzte Methylester. Das Dipeptid XV neigt etwas weniger zur Bildung von Diketopiperazin als der Methylester VIII. Der teure, aufwendig herzustellende Baustein XX wird in einer späteren Synthesestufe eingesetzt, so daß weniger von dieser Verbindung gebraucht wird.

Nachteilig am Verfahren von Poncet (Schema 2) ist, daß der tert.-Butylester mehr Aufwand bei der Herstellung als der Methylester erfordert. Ebenso aufwendig ist die Spaltung dieses Esters mit Trifluoressigsäure, bei der ein brennbares, explosionsfähiges Gas 5 und fluorhaltige, schwierig zu entsorgende Abfälle entstehen.

Nach der Verknüpfung von XIX und XX zu Dolastatin 15 muß zudem noch der Z-Rest gegen zwei Methylgruppen ausgetauscht werden (Schema 3). Bei dieser Operation gehen auf einer späteren 10 Synthesestufe nochmals 20 % des wertvollen Materials verloren.

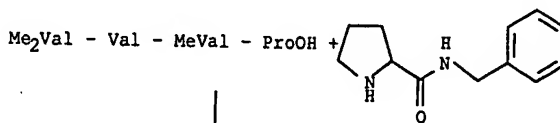


15

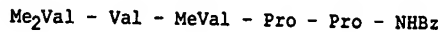
Dolastatin 15

Die Verfahren von Pettit und Poncet lassen sich auch zur Herstellung 20 zahlreicher Wirkstoffe der WO 93/23.424 nutzen, die strukturell mit Dolastatin 15 verwandt sind. Beispielsweise läßt sich die Tetrapeptidsäure XI mit Prolinbenzylamid zum Wirkstoff Nr. 234 aus WO 93/23.424 verknüpfen (Schema 4).

25



30



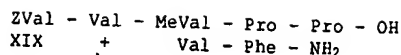
= Wirkstoff Nr. 234 aus WO 93 - 23.424

35

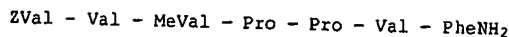
In analoger Weise läßt sich die Pentapeptidsäure XIX aus Schema 2 mit einem Dipeptid zum Heptapeptid XXII umsetzen, aus dem dann Wirkstoff Nr. 1 aus WO 93/23.424 hergestellt werden kann 40 (Schema 5).

45

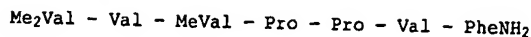
5



5



10



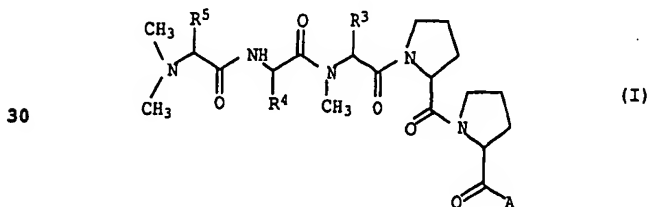
- Wirkstoff Nr. 1 aus WO 93/23.424

15 Bei der Wirkstoffherstellung über XIX und XI beeinträchtigen die oben beschriebenen Probleme die Ausbeuten und die technische Durchführbarkeit der Peptidsynthese.

Es wurde nun ein neues Verfahren gefunden, das den Zugang zu den
20 genannten Wirkstoffen erleichtert und auch für die Synthese des Naturstoffes Dolastatin 15 Vereinfachungen bringt.

Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung von
25 Pentapeptiden der Formel I

25



35

in der

A OH oder eine NR^1R^2 -Gruppe ist, worin R^1 und R^2 unabhängig voneinander Wasserstoff, C_1 -7-Alkyl, Phenyl mit 1, 2 oder 3 Substituenten (unabhängig voneinander C_1 -6-Alkyl, CF_3 , Nitro, Halogen) oder Benzyl mit bis zu drei Substituenten (unabhängig voneinander C_1 -6-Alkyl, CF_3 , Nitro, Halogen) bedeuten,

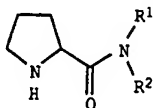
45 R^3 für Ethyl, Isopropyl, Isobutyl, tert.-Butyl oder 1-Methylpropyl steht,

6

R⁴ für Ethyl, Isopropyl, Isobutyl, tert.-Butyl oder 1-Methylpropyl steht und

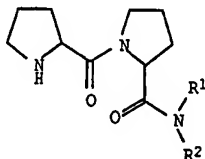
5 ^{R⁵} für Ethyl, Isopropyl, Isobutyl, tert.-Butyl oder 1-Methylpropyl steht,

welches darin besteht, daß man ein Prolinamid der Formel II



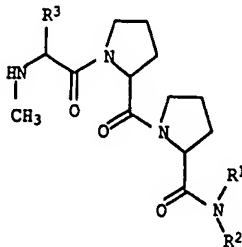
(II)

in der R¹ und R² die oben angegebene Bedeutungen haben, in das
15 Dipeptid der Formel III überführt



(III)

in der R¹ und R² die oben genannten Bedeutungen haben, dieses in
25 das Tripeptid der Formel IV überführt



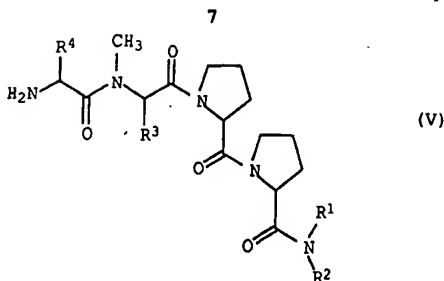
(IV)

35

worin R¹, R² und R³ die oben genannten Bedeutungen haben, dieses in das Tetrapeptid der Formel V

40

45



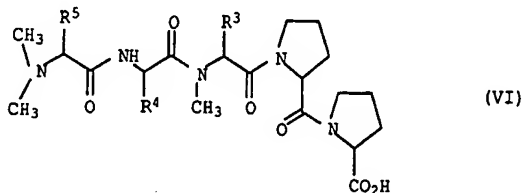
5

10

in der R^1 , R^2 , R^3 und R^4 die oben genannten Bedeutungen haben, und dieses in das Pentapeptid der Formel I überführt und das so erhaltene Pentapeptid I nach Bedarf mit Prolylendopeptidase (PEP) zur Pentapeptidcarbonsäure VI hydrolysiert

15

20



25

Das Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, daß man von Prolinamiden der Formel II ausgeht und daraus über die Peptide III, IV und V zu den Wirkstoffen I gelangt.

30 Die Verbindungen II, III, IV, V und I können als freie Basen eingesetzt werden. Oft ist es von Vorteil, die Salze dieser Verbindungen mit unterschiedlichen Säuren zu verwenden.

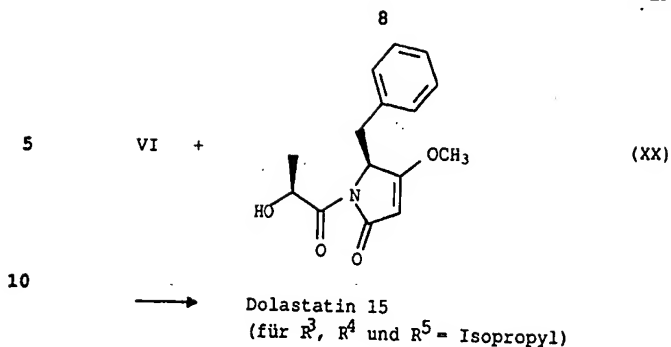
Als Säuren kommen beispielsweise in Frage: HCl, HBr, H_3PO_4 , H_2SO_4 , Malonsäure, Oxalsäure, Fumarsäure, Maleinsäure, Toluolsulfonsäure, Methansulfonsäure.

35

Die Verbindungen I und VI sind aus WO 93/23.424 bekannt. Sie stellen wertvolle Peptidwirkstoffe und lassen sich zu anderen Wirksubstanzen weiterverarbeiten, wie beispielsweise zum Naturstoff Dolastatin 15. Dazu wird VI nach den üblichen Methoden aktiviert und wie von Poncet et al. (Tetrahedron 48, 4115 - 4122, 1992) beschrieben mit Baustein XX umgesetzt.

40

45



Weitere Wirkstoffe der WO93/23.424 erhält man nach üblichen Methoden der Peptidkopplung aus VI und Aminosäuren bzw. Peptiden.

Die Vorteile des neuen Verfahrens zur Herstellung der genannten Verbindungen und insbesondere des Naturstoffes Dolastatin 15 bestehen im folgenden:

20 Die Ausgangsverbindungen sind gut zugängliche Prolinamide, die auch in Form ihrer kristallinen Hydrochloride nicht hygroskopisch sind.

25 Bei der Herstellung des Dipeptides besteht nur in untergeordnetem Maß die Gefahr einer Bildung von Diketopiperazinen. Sowohl beim Verfahren von Pettit als auch bei der Synthesemethode von Poncet muß vor allem bei den längeren Verweilzeiten einer technischen Synthese mit der Bildung von Diketopiperazinen gerechnet werden.

30 Im Verlauf des neuen Verfahrens ist bei allen Kopplungsstufen die endständige Carboxylgruppe als Amid sehr wirksam geschützt und mit Prolylendopeptidase (PEP) hochspezifisch und einfach abspaltbar. Der von Pettit verwendete Methylester wird hingegen partiell
35 gespalten, während der von Poncet genutzte tert.-Butylester technisch schwieriger herzustellen ist und Probleme bei der Abspaltung bereitet.

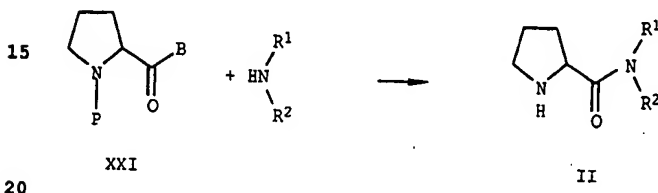
Der Baustein XX wird im neuen Verfahren erst in der allerletzten
40 Synthesestufe benötigt, so daß von dieser Substanz weniger benötigt wird als bei dem nur mit großem Aufwand durchführbaren Verfahren von Poncet.

Das erfindungsgemäße Verfahren bietet nicht nur einen guten
45 gang zu Dolastatin 15, sondern ermöglicht auch eine sehr praktische Synthese für zahlreiche Wirkstoffe, die in der WO 93/23.424 genannt sind. Die genannte Patentanmeldung beschreibt die Her-

stellung der antineoplastischen Peptide über eine Festphasensynthese. Diese Methode ist für die Herstellung im technischen Maßstab sehr wenig geeignet.

- 5 Die folgenden Beispiele beschreiben das erfindungsgemäße Verfahren.

Prolinamide der Struktur II werden aus Prolinderivaten der Formel XXI hergestellt in der A für einen aktivierenden Substituenten
 10 wie Methoxycarbonyl oder Pivaloyl und P für eine Schutzgruppe z. B. tert.-Butoxycarbonyl (BOC) oder Benzyloxycarbonyl (Z) stehen.



Beispiel 1: Prolinbenzylamid-Hydrochlorid

Zu einer Lösung von 99,7 g Z-Prolin und 58 ml Triethylamin in 1 l
 25 CH_2Cl_2 wurden bei -10°C bis 15°C 48,2 g Pivalinsäurechlorid zuge-
 tropft. Man rührte 45 min bei -10°C nach und gab anschließend in-
 nerhalb 0,5 h bei -10°C 42,8 g Benzylamin in 500 ml CH_2Cl_2 zu. Man
 rührte 1 h bei Raumtemperatur nach. Die CH_2Cl_2 -Lösung wurde an-
 schließend zweimal mit 500 ml Wasser, zweimal mit 500 ml 10 %iger
 30 wäßriger NaHCO_3 -Lösung, zweimal mit 500 ml Wasser, zweimal mit
 500 ml 5 %iger wäßriger Zitronensäure-Lösung und zweimal mit
 500 ml Wasser gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und eingedampft.
 Es verblieben 120 g Rückstand, der in 200 ml Essigester aufgenom-
 men wurde. Man gab zur Essigesterlösung 1,2 l n-Heptan zu, rührte
 35 1 h, saugte ab und trocknete bei 50°C im Vakuum. Das so erhaltene
 Z-Prolinbenzylamid (110 g, Fp. $93-94^\circ\text{C}$) wurde in 1,5 l Methanol
 gelöst. Nach Zugabe von 0,5 g Pd/C (10 %) wurde Wasserstoff
 eingeleitet. Die Lösung nahm bei Raumtemperatur innerhalb von
 1,5 h 0,5 l H_2 auf. Nach Abfiltrieren des Katalysators und Ein-
 40 dampfen verblieben 4,6 g eines gelben Öls, das ohne weitere Rei-
 nigung weiter eingesetzt werden konnte. Hochreines Produkt wurde
 durch Fällung des Prolinbenzylamid-Hydrochlorids gewonnen. Dazu
 wurden 4,1 g Prolinbenzylamid in 400 ml Isopropanol gelöst. Man
 gab 63 ml einer gesättigten Lösung von HCl in Isopropanol zu,
 45 rührte die entstandene Suspension 2 h bei 0°C bis -5°C , saugte ab
 und wusch zweimal mit 250 ml Isopropanol. Der Rückstand wurde bei

50°C im Vakuum getrocknet. Man erhielt 4 g Prolinbenzylamid-Hydrochlorid, $[\alpha]^{20}_D = -45^\circ$.

Dipeptide der Struktur III werden aus Prolinamiden II und geeigneten Prolinderivaten nach den üblichen Methoden der Peptidkopplung hergestellt.

Beispiel 2: Pro-Pro-NHBz x HCl

- 10 Zu einer Lösung von 249 g Z-Prolin und 202,4 g Triethylamin in 2 l CH_2Cl_2 wurde bei -5°C bis -10°C innerhalb von 20 min 120,6 g Pivalinsäurechlorid zugetropft. Man rührte 60 min bei -55°C und gab anschließend bei -5°C bis -10°C innerhalb von 30 min eine Lösung von 246 g Prolinbenzylamid-Hydrochlorid in 300 ml Methanol
- 15 zu. Man rührte 1 h bei unter 0°C und 15 h bei Raumtemperatur. Die Lösung wurde gewaschen mit 1 l H_2O , 1 l 10 %iger Essigsäure, 1 l H_2O , 1 l 10 %iger NaOH und 1 l H_2O . Die organische Phase wurde zur Trocknung eingeengt. Der Rückstand wurde in 1 l Methanol aufgenommen und 1 h zum Rückfluß erwärmt. Methanol wurde durch 2,5 l
- 20 Isopropanol ersetzt. Nach Zusatz von 30 g Pd/C (5 %ig) wurde 4 h bis zur Sättigung Wasserstoff eingeleitet. Nach Zugabe von 120 ml gesättigter isopropanolischer Lösung von HCl wurde vom Katalysator abfiltriert. Die Mutterlauge wurde eingeengt und der Rückstand mit 400 l Isopropanol versetzt. Nach Beginn der Kristallisation wurden 2 l Methyl-tert.-butylether zugegeben. Man rührte
- 25 15 h bei Raumtemperatur, saugte ab, wusch mit Methyl-tert.-butylether und trocknete im Vakuum. Ausbeute: 277 g (81,3 %, $\text{Fp. } 185,5\text{--}187^\circ\text{C}$, $[\alpha]^{20}_D = -96^\circ$).
- 30 Tripeptide der Struktur IV wurden aus den Dipeptiden III und geeigneten Derivaten von N-Methylaminosäuren (wie z. B. N-Methylvalin, N-Methylleucin, N-Methyl-Isoleucin, N-Methyl-tert.-Leucin) nach den üblichen Methoden der Peptidkopplung hergestellt.

35 Beispiel 3: MeVal-Pro-Pro-NHBz x HCl

- Zu einer Lösung von 199,5 g Z-MeVal und 253 g Pro-Pro-NHBz x HCl und 417 g Diisopropylethylamin wurde innerhalb von 40 min bei -5 bis -10°C 636 g einer 50 %igen Lösung von Propanphosphorsäureanhydrid in Essigester zugetropft. Man rührte 15 h bei Raumtemperatur, gab 1 l Wasser zu und wusch die organische Phase mit 750 ml
- 40 10 %iger Essigsäure, 750 ml Wasser, 750 ml 10 %iger NaOH und 750 ml Wasser. Die organische Phase wurde eingeengt und der Rückstand in 2,5 l Isopropanol aufgenommen. Nach Zugabe von 90 g Pd/C
- 45 (5 %ig) wurde 8 h lang H_2 eingeleitet. Nach Abfiltrieren des Katalysators wurde eingedampft. Der Rückstand wurde in 800 ml Isopropanol gelöst, mit 100 ml Isopropanolischer HCl versetzt und

bei 45°C angeimpft. Nach Zugabe von 2 l Methyl-tert.-butylether wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt, abgesaugt, mit Isopropanol gewaschen und getrocknet. Ausbeute 313 g (92,5 %), Fp. 243-244°C, $[\alpha]^{20}_D = -141^\circ$.

5

Tetrapeptide der Struktur V wurden aus den Tripeptiden IV und geeigneten Derivaten der Aminosäuren Valin, α -Aminobuttersäure, Leucin, tert.-Leucin und Isoleucin hergestellt.

10 Beispiel 4: Val-MeVal-Pro-Pro-NHBz x HCl

- Zu einer Lösung von 188,5 g 2-Valin und 151,2 g Triethylamin in 1,5 l CH_2Cl_2 wurde bei -5°C bis -10°C innerhalb von 20 min 94,5 g Pivalinsäurechlorid zugetropft. Nach 90 min Rühren bei -5 bis
- 15 -10°C wurde innerhalb von 40 min bei -5°C bis -10°C 337,5 g MeVal-Pro-Pro-NHBz x HCl portionsweise zugegeben. Man rührte 15 h bei Raumtemperatur, setzte 750 ml Wasser zu und wusch die organische Phase mit 750 ml 10 %iger Essigsäure, 750 ml Wasser, 750 ml 10 %iger NaOH und 750 ml Wasser. Die organische Phase wurde ein-
- 20 geengt. Der Rückstand wurde in 2 l Methanol gelöst und 1 h zum Rückfluß erwärmt. Nach Zugabe von 30 g Pd/C (5 %ig), in 60 ml Wasser aufgeschlämmt, wurde bis zur Sättigung (2,5 h) Wasserstoff eingeleitet. Nach Abfiltrieren des Katalysators wurde bis zur Trockne eingeengt. Der Rückstand wurde mit 600 ml Isopropanol
- 25 versetzt und mit 120 ml 30 %iger isopropanolischer HCl angesäuert. Nach Animpfen wurde 15 h bei Raumtemperatur gerührt. Zum Kristallbrei wurden 2 l Methyl-tert.-butylether zugegeben. Nach 2 h Rühren wurde abgesaugt, mit Isopropanol gewaschen und getrocknet. Man erhielt 306 g (74,1 % Ausbeute), Fp. 205-208, 5°C,
- 30 $[\alpha]^{20}_D = -179,5^\circ$.

- Pentapeptide der Struktur V wurden aus den Tetrapeptiden und geeigneten Derivaten der Aminosäuren Valin, α -Aminoisobuttersäure, Leucin, tert.-Leucin und Isoleucin hergestellt. Die endständigen
- 35 Methylgruppen konnten nach der Kopplung zum Pentapeptid eingeführt werden. Alternativ können auch geeignete Derivate von N,N-Dimethylvalin, N,N-Dimethyl-aminoisobuttersäure, N,N-Dimethylleucin, N,N-Dimethyl-tert.-Leucin und N,N-Dimethylisoleucin eingesetzt werden.

40

Beispiel 5: Me₂Val-Val-MeVal-Pro-Pro-NHBz x HCl
(Wirkstoff Nr. 234 aus WO 93/23.424)

- Zu einer Lösung von 8,7 g N,N-Dimethylvalin, 27,4 g Val-MeVal-
- 45 Pro-Pro-NHBz x HCl und 21,6 g Triethylamin in 100 ml CH_2Cl_2 wurden 42,4 g einer 50 %igen Lösung von Propanphosphorsäureanhydrid in Essigester bei 0 bis -6°C innerhalb von 20 min zugetropft. Man

rührte 1 h in der Kälte und über Nacht bei Raumtemperatur. Die organische Phase wurde mit 50 ml Wasser gewaschen und eingeeengt. Der Rückstand wurde in 50 ml Isopropanol gelöst und mit 10 ml 30 %iger isopropanolischer HCl angesäuert. Man impfte an, setzte bei 60°C 150 ml Methyl-tert.-Butylether zu, rührte über Nacht, saugte ab, wusch mit Isopropanol und trocknete. Man erhielt 29,9 g (88,3 % Ausbeute) $[\alpha]^{20}_D = -180,3^\circ\text{C}$.

Die Pentapeptidsäuren VI wurden aus den Pentapeptidamiden V durch Hydrolyse mit Prolylendopeptidase (T. Yoshimoto et al., J. Biol. Chem., 255, 4786 (1980), J. Biochem. 110, 873 (1991)) gewonnen. Besonders geeignete Substrate sind dabei die Benzylamide. Alkylamide lassen sich auch hydrolysieren, reagieren aber wesentlich langsamer.

15

Die Pentapeptidcarbonsäure VI a = Me₂Val - Val - MeVal - Pro - ProOH ist der geeignete Vorläufer für den Naturstoff Dolastatin 15. Dazu muß VI a mit dem Hydroxysäureamid XX gekoppelt werden. Eine geeignete Synthese für XX beschreiben J. Poncet et al. in Tetrahedron 48 (20) 4115 - 4122 (1992).

Beispiel 6: Herstellung von Dolastatin 15

Zu einer Lösung von 6 g VI a, 3,0 g XX, 2,0 g DMAP und 2,0 g Triethylamin in 150 ml Methylchlorid wurde bei 0°C eine Lösung von 2,4 g Isopropenylchloroformiat in 20 ml Methylenchlorid zuge-
tropft. Man rührte 15 min bei 0°C und 4 h bei Raumtemperatur. Man wusch mit Wasser, 5 %iger wäßriger NaHCO₃-Lösung und Wasser, trocknete über Na₂SO₄ und engte ein. Der Rückstand wurde in Hexan/
Essigester gelöst und über Kieselgel chromatographiert. Ausbeute: 5,8 g amorpher Feststoff.

35

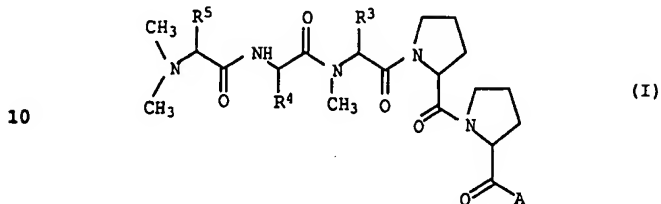
40

45

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von Pentapeptiden der Formel I

5



10

15

in der

A OH oder eine NR^1R^2 -Gruppe ist, worin R^1 und R^2 unabhängig voneinander Wasserstoff, C_1 - γ -Alkyl, Phenyl mit bis zu drei Substituenten (unabhängig voneinander Alkyl, CF_3 , Nitro, Halogen) oder Benzyl mit bis zu drei Substituenten (unabhängig voneinander Alkyl, CF_3 , Nitro, Halogen) bedeuten,

20

R^3 für Ethyl, Isopropyl, Isobutyl, tert.-Butyl oder 1-Methylpropyl steht,

25

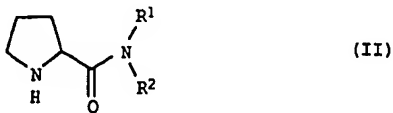
R^4 für Ethyl, Isopropyl, Isobutyl, tert.-Butyl oder 1-Methylpropyl steht und

R^5 für Ethyl, Isopropyl, Isobutyl, tert.-Butyl oder 1-Methylpropyl steht,

30

dadurch gekennzeichnet, daß man ein Prolinamid der Formel II

35

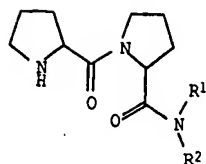


in der R^1 und R^2 die oben angegebene Bedeutungen haben, in das Dipeptid der Formel III überführt

40

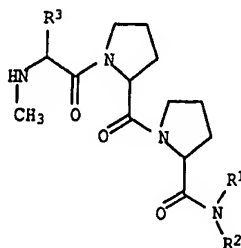
45

14



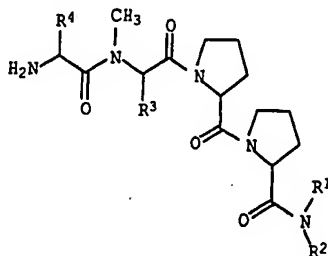
(III)

in der R^1 und R^2 die oben genannten Bedeutungen haben, dieses in das Tripeptid der Formel IV überführt



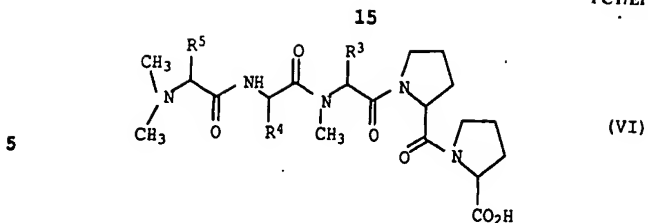
(IV)

worin R^1 , R^2 und R^3 die oben genannten Bedeutungen haben, dieses in das Tetrapeptid der Formel V



(V)

in der R^1 , R^2 , R^3 und R^4 die oben genannten Bedeutungen haben, und dieses in das Pentapeptid der Formel I überführt und das so erhaltene Pentapeptid I nach Bedarf mit Prolylendopeptidase (PEP) zur Pentapeptidcarbonsäure VI hydrolysiert



- 10 2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man die Substanzen der Formeln II, III, IV, V und I in Form ihrer Salze einsetzt.
- 15 3. Vorprodukte zur Herstellung peptidischer Wirkstoffe mit den Formeln III, IV und V, in denen R¹, R², R³ und R⁴ die oben genannten Bedeutungen haben.
- 20 4. Verwendung der Verbindung der Formel VI, worin R³, R⁴ und R⁵ Methylgruppen darstellen, zur Herstellung von Dolastatin 15.

25

30

35

40

45

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 96/03073

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C07K7/06 C07K5/06 C07K5/08 C07K5/10

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched. (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FR 2 460 292 A (GEDEON RICHTER) 23 January 1981 see example 3	3
X	--- MONATSHFTE FUR CHEMIE, vol. 109, no. 1, March 1978, WIEN AT, pages 147-155, XP002019748 J HAUSLER & U SCHMIDT: "Ringschlüsse von Pyruvoylpeptiden und Dehydropeptiden" see page 151 --- -/-	3

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *A* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

28 November 1996

Date of mailing of the international search report

06. 12. 96

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tdl. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Masturzo, P

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 96/03073

C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FEBS LETTERS, vol. 227, no. 2, January 1988, AMSTERDAM NL, pages 171-174, XP002019749 J LASCH ET AL.: "Enzymic properties of intestinal aminopeptidase P: a new continuous assay" see example 2.1.5 ---	3
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 115, no. 25, 23 December 1991 Columbus, Ohio, US; abstract no. 280575j, H KIMURA ET AL.: "Preparation of helodermin fragments as antiasthmatic" page 1072; XP002019752 see abstract & JP 03 141 298 A (M D RESEARCH K K) 23 December 1991 ---	3
X	Chemical Abstracts, 12th Collective Index, Chemical Substances, Volumes 106-115, Registry Number 137617-30-2 XP002019751 & CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 115, no. 25, 23 December 1991 Columbus, Ohio, US; abstract no. 280575j, page 1072; see abstract ---	3
A	WO 93 23424 A (BASF AG) 25 November 1993 cited in the application see the whole document ---	1,2,4
A	TETRAHEDRON, vol. 48, no. 20, 15 May 1992, OXFORD GB, pages 4115-4122, XP002019750 N PATINO ET AL.: "Total synthesis of the proposed structure of Dolastatin 15" cited in the application see the whole document -----	1,2,4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 96/03073

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
FR-A-2460292	23-01-81	AT-B- 392644	10-05-91
		AT-B- 373578	10-02-84
		AU-B- 538100	26-07-84
		AU-A- 5971980	08-01-81
		BE-A- 884014	29-12-80
		CA-A- 1151154	02-08-83
		CH-A- 650518	31-07-85
		DE-A- 3024313	29-01-81
		GB-A, B 2058080	08-04-81
		JP-A- 56036442	09-04-81
		NL-A- 8003767	30-12-80
		SE-B- 447261	03-11-86
		SE-A- 8004744	29-12-80
		SU-A- 963463	30-09-82
		US-A- 4299821	10-11-81
WO-A-9323424	25-11-93	AU-B- 669710	20-06-96
		AU-A- 4066293	13-12-93
		CA-A- 2136339	25-11-93
		CN-A- 1085563	20-04-94
		CZ-A- 9402843	17-05-95
		EP-A- 0642530	15-03-95
		FI-A- 945416	17-11-94
		HU-A- 71398	28-11-95
		JP-T- 7506580	20-07-95
		NO-A- 944419	09-01-95
		NZ-A- 252147	28-10-96
		SI-A- 9300267	31-12-93

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internat. des Aktenzeichen

PCT/EP 96/03073

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 C07K7/06 C07K5/06 C07K5/08 C07K5/10

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfung (Klassifikationssystem und Klassifikations Symbole)

IPK 6 C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfung gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	FR 2 460 292 A (GEDEON RICHTER) 23. Januar 1981 siehe Beispiel 3	3
X	MONATSCHEFTE FÜR CHEMIE, Bd. 109, Nr. 1, März 1978, WIEN AT, Seiten 147-155, XP002019748 J HÄUSLER & U SCHMIDT: "Ringschlüsse von Pyruvoylpeptiden und Dehyropeptiden" siehe Seite 151	3

-/-

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" Älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"A" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

28. November 1996

Abschließdatum des internationalen Recherchenberichts

06. 12. 96

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentaan 2
NL - 2240 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Beauftragter

Masturzo, P

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internat. Aktenzeichen

PCT/EP 96/03073

C (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	FEBS LETTERS, Bd. 227, Nr. 2, Januar 1988, AMSTERDAM NL, Seiten 171-174, XP002019749 J LASCH ET AL.: "Enzymic properties of intestinal aminopeptidase P: a new continuous assay" siehe Beispiel 2.1.5 ---	3
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 115, no. 25, 23. Dezember 1991 Columbus, Ohio, US; abstract no. 280575j, H KIMURA TE AL.: "Preparation of helodermin fragments as antiasthmatic" Seite 1072; XP002019752 siehe Zusammenfassung & JP 03 141 298 A (M D RESEARCH K K) 23. Dezember 1991 ---	3
X	Chemical Abstracts, 12th Collective Index, Chemical Substances, Volumes 106-115, Registry Number 137617-30-2 XP002019751 & CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 115, no. 25, 23. Dezember 1991 Columbus, Ohio, US; abstract no. 280575j, Seite 1072; siehe Zusammenfassung ---	3
A	WO 93 23424 A (BASF AG) 25. November 1993 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	1,2,4
A	TETRAHEDRON, Bd. 48, Nr. 20, 15. Mai 1992, OXFORD GB, Seiten 4115-4122, XP002019750 N PATINO ET AL.: "Total synthesis of the proposed structure of Dolastatin 15" in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument -----	1,2,4

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichung, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 96/03073

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
FR-A-2460292	23-01-81	AT-B- 392644	10-05-91
		AT-B- 373578	10-02-84
		AU-B- 538100	26-07-84
		AU-A- 5971980	08-01-81
		BE-A- 884014	29-12-80
		CA-A- 1151154	02-08-83
		CH-A- 650518	31-07-85
		DE-A- 3024313	29-01-81
		GB-A, B 2058080	08-04-81
		JP-A- 56036442	09-04-81
		NL-A- 8003767	30-12-80
		SE-B- 447261	03-11-86
		SE-A- 8004744	29-12-80
		SU-A- 963463	30-09-82
		US-A- 4299821	10-11-81
WO-A-9323424	25-11-93	AU-B- 669710	20-06-96
		AU-A- 4066293	13-12-93
		CA-A- 2136339	25-11-93
		CN-A- 1085563	20-04-94
		CZ-A- 9402843	17-05-95
		EP-A- 0642530	15-03-95
		FI-A- 945416	17-11-94
		HU-A- 71398	28-11-95
		JP-T- 7506580	20-07-95
		NO-A- 944419	09-01-95
		NZ-A- 252147	28-10-96
		SI-A- 9300267	31-12-93